

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

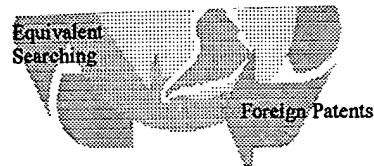
# Request Form for Translation

Translation Branch  
The world of foreign prior art to you.

U. S. Serial No. : 09/674,280  
Requester's Name: Afremova  
Phone No. : 308-9357  
Fax No. : \_\_\_\_\_  
Office Location: CU 1 1E13  
Art Unit/Org. : 1657  
Group Director: \_\_\_\_\_  
Is this for Board of Patent Appeals? NO

PTO 2001-3342

S.T.I.C. Translations Branch



Phone: 308-0881  
Fax: 308-0989  
Location: Crystal Plaza 3/4  
Room 2C01

Date of Request: 6/26/01  
Date Needed By: \_\_\_\_\_  
(Please do not write ASAP-indicate a specific date)

SPE Signature Required for RUSH:

## Document Identification (Select One):

**\*\* (Note: Please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form)\*\***

1. ☒ Patent Document No. 50-19976  
JP 50019996  
Language Japanese  
Country Code JP  
Publication Date 3/03/1975  
Pages \_\_\_\_\_ (filled by STIC)
2. ☐ Article Author \_\_\_\_\_  
Language \_\_\_\_\_  
Country \_\_\_\_\_
3. ☐ Other Type of Document \_\_\_\_\_  
Country \_\_\_\_\_  
Language \_\_\_\_\_

## Document Delivery (Select Preference):

- \_\_\_\_\_ Delivery to nearest EIC/Office Date: 7/27 (STIC Only)  
\_\_\_\_\_ Call for Pick-up Date: \_\_\_\_\_ (STIC Only)  
\_\_\_\_\_ Fax Back Date: \_\_\_\_\_ (STIC Only)

## STIC USE ONLY

### Copy/Search

Processor: NJC  
Date assigned: 6/28  
Date filled: 7/2  
Equivalent found: \_\_\_\_\_ (Yes/No)

Doc. No.: \_\_\_\_\_  
Country: \_\_\_\_\_

Remarks: \_\_\_\_\_

### Translation

Date logged in: 6/28 7.3.01  
PTO estimated words: 5456  
Number of pages: 15  
In-House Translation Available: \_\_\_\_\_  
In-House: \_\_\_\_\_ Contractor: \_\_\_\_\_  
Translator: \_\_\_\_\_ Name: mc  
Assigned: \_\_\_\_\_ Priority: K  
Returned: \_\_\_\_\_ Sent: 7.3.01  
Returned: 7/20

To assist us in providing the most cost effective service, please answer these questions:

Will you accept an English Language Equivalent?

Yes (Yes/No)

Will you accept an English abstract?

No (Yes/No)

Would you like a consultation with a translator to review the document prior to having a complete written translation?

Y/N (Yes/No)

PTO 01-3342

Japanese Kokai Patent Application  
No. Sho 50[1975]-19996 [sic; 1996]

**METHOD FOR MANUFACTURING THICK SOY SAUCE**

**Seiji Kitahara, et al.**

**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
WASHINGTON, D.C. JULY 2001  
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY**

JAPANESE PATENT OFFICE  
PATENT JOURNAL  
KOKAI PATENT APPLICATION NO. SHO 50[1975]-19996

Japanese Cl.:	36(5)C2
Sequence Nos. for Office Use:	7435 49
Filing No.:	Sho 48[1973]-70878
Filing Date:	June 25, 1973
Publication Date:	March 3, 1975
	(Total of 7 pages)
Examination Request:	Filed

METHOD FOR MANUFACTURING THICK SOY SAUCE

[Nencho shoyu no seizo hoho]

Inventors:	Seiji Kitahara, et al.
Applicant:	Kikkoman Soy Sauce Co., Ltd.

[There are no amendments to this patent.]

Claim

A method for manufacturing thick soy sauce characterized by the fact that when the soy sauce seed yeast is manufactured, cells of a strain of *Aerobacter*, and able to produce high-viscosity polysaccharides, or their culture, are inoculated and cultured beforehand, at the same time, or before or after inoculation of the soy sauce yeast cells, or they are mixed with the seed yeast prepared using the conventional method for use, or they are inoculated during the conventional manufacturing process of the soy sauce yeast, followed by yeast formation, loading, and ripening.

---

\* [Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.]

### Detailed explanation of the invention

This invention pertains to a method for manufacturing thick soy sauce. The purpose of this invention is to provide a method for manufacturing thick soy sauce by means of cells of a strain of *Aerobacter*, and able to produce high-viscosity polysaccharides, or the culture of said cells, with the manufactured thick soy sauce having excellent viscosity, flavor and dispersibility.

In the prior art, thick soy sauce is manufactured by adding C.M.C., gelatin, gum arabic, glycerin, soluble starch or other commercially available thickener (see: Chomi Kagaku, Vol. 18, No. 2, pp. 35-42, 1971), or refined pectin agent (see: Japanese Kokoku Patent No. Sho 38[1963]-9941), etc. directly into the commercially available soy sauce.

However, when the aforementioned thickener is simply added into soy sauce, although viscosity can be increased by a certain degree, the dispersibility, flavor and taste of the soy sauce itself become degraded.

In order to solve the aforementioned problem, the present inventors have performed extensive tests and research. As a result, a high-viscosity substance, which is a strain of *Aerobacter*, and has excellent properties, was manufactured by separation from stagnant water taken from a well; with said strain used as the medium for culturing the feed material for manufacturing soy sauce in a conventional method, a type of yeast for soy sauce with excellent properties was manufactured, and a significant amount of said high-viscosity substance was formed during manufacturing of the soy sauce yeast; and, it was found that when said strain is used in manufacturing, a type of soy sauce with excellent viscosity, flavor, dispersibility, etc. can be obtained. Based on these findings, this invention was reached.

That is, this invention provides a method for manufacturing thick soy sauce characterized by the fact that when the seed yeast for soy sauce is manufactured, cells of a strain of *Aerobacter* and able to produce high-viscosity polysaccharides, or their culture, are inoculated and cultured beforehand, at the same time, or before or after inoculation of the soy sauce yeast cells, or they are mixed with the seed yeast prepared using the conventional method for use, or they are inoculated during the conventional manufacturing process of the soy sauce yeast, followed by yeast formation, loading, and ripening.

The thick soy sauce manufactured using the method of this invention has excellent fragrance, good dispersibility and high viscosity with a specific viscosity in the range of about 5-200.

In the following, the microbes used in this invention will be explained in more detail.

*Aerobacter cloacae* N414-M, a strain of microbes used in the method of this invention, is deposited in the Microorganism Industrial Technical Research Institute of the Agency of Industrial Science and Technology, with deposition number of FERM-P No. 1779. In the following, we will present first a detailed explanation on the microbial properties of the strain.

**[I] Form****1. Shape and size of the cells**

Short bacillus, 1.0  $\mu\text{m}$ , 1.5-2.0  $\mu\text{m}$

**2. Polymorphism Yes/No: No****3. Mobility Yes/No: Yes (the cell has one or two flagella).****4. Spores Yes/No: No****5. Gram staining: Negative****6. Capsule staining: Observed****[II] State of growth in various culture media****1. Culturing on flat broth agar plate (observation after culturing at 30°C for 24 h)**

Bump-shaped circular growth spots, diameter of 2-5 mm, are observed.

Surface is smooth, glossy, and opaque.

Peripheral edge is circular.

**2. Culturing on broth agar slant**

Linear medium growth is displayed. Color is light yellowish-brown. It is glossy and opaque. In particular, there is no odor, and there is no change in the color of the medium.

**3. Culturing in broth liquid**

Intermediate growth is displayed. Little brittle rings are formed. There is a significant amount of precipitation, and it is sticky.

**4. Culturing by piercing through broth gelatin**

The upper portion has the best growth, and a very weak liquidity is displayed. The liquefied portion has volcano shape.

**5. Litmus milk**

Acid is formed, and is coagulated. There is no peptone formation.

**6. Culturing on flat gelatin plate**

Spotty growth is displayed with liquefying. The colonies display light yellowish color.

**7. Culturing on potato agar.**

Intermediate growth is displayed. Color is light yellowish-white with gloss. It is smooth and no dye is formed.

**[III] Physiological properties****1. Reduction of nitrate: +****2. MR test: -****3. VP test: +****4. Formation of indole: -**

5. Formation of hydrogen sulfide (on T.S.I. medium): -
6. Hydrolysis of starch: - (2-day culturing)
7. Simmons' citrate medium: Decomposition
8. Decomposition property of  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ : It can be used as a single nitrogen source.
9. Formation of dye: -
10. Urease (Christensen's method): -
11. Oxidase (Kobaku's method): -
12. Catalase: +
13. Range allowing growth: pH 4.0-9.0, temperature 5-42°C
14. Optimum range for growth: pH 6.0-7.0, temperature 30-37°C
15. Property with respect to oxygen: Facultative aerobic
16. O-F test (Foo & Riverson [transliteration] medium)  
 Glucose: Acid and gas are formed  
 Sucrose: Acid and gas are formed  
 Lactose: Acid alone is formed
17. McConkey medium: Formation of light reddish-violet colonies
18. Formation of ammonia: +
19. Mannitol agar medium: No growth
20. Gas composition (glucose medium):  $\text{CO}_2:\text{H}_2=3:1$

[IV] Ability to use carbon resources (still culture for 14 days at 30°C)

1. Fermentation of saccharides

The fermentation test method proposed by G. B. Robbins, et al. (J. Bact., 39, 399, 1940) was adopted.

	A B			A B	
	酸生成	ガス生成		酸生成	ガス生成
(1) L-アラビノース	+	+	(13) デンプン	+	±
(2) D-キシロース	+	+	(14) ラムノース	-	-
(3) D-グルコース	+	+	(17) メリビオース	+	+
(4) D-マンノース	+	+	(18) セロビオース	+	+
(5) D-フラクトース	+	+	(19) ラフィノース	+	+
(6) D-ガラクトース	+	+	(20) メレチトース	-	-
(7) マルトース	+	+	(21) イヌリン	-	-
(8) シュークロース	+	+	(22) デキストリン	+	+
(9) ラクトース	+	±	(23) グリコーゲン	-	-
(10) トレハロース	+	+	(24) アドニトール	-	-
(11) D-ソルビトール	+	+	(25) ズルニトール	-	-
(12) D-マニトール	+	+	(26) サリシン	+	+
(13) イノシトール	±	-	(27) エスクリン	+	+
(14) グリセロール	+	-	(28) α-ノチルイグランド	+	+

Key: A Acid formation  
B Gas formation

- (1) L-arabinose
- (2) D-xylose
- (3) D-glucose
- (4) D-mannose
- (5) D-fructose
- (6) D-galactose
- (7) Maltose
- (8) Sucrose
- (9) Lactose
- (10) Trehalose
- (11) D-sorbitol
- (12) D-mannitol
- (13) Inositol
- (14) Glycerol
- (15) Starch
- (16) Rhamnose
- (17) Melibiose
- (18) Cellobiose
- (19) Raffinose
- (20) Melezitose
- (21) Inulin
- (22) Dextrin
- (23) Glycogen
- (24) Adonitole



- (25) Dulcitol  
 (26) Salicin  
 (27) Aesculin  
 (28)  $\alpha$ -methyl gokukoside [sic; glucoside]

## 2. Decomposition properties of organic acids and carbon compounds

The test was performed on a medium composed of 0.1% of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.1% of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5% of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and 0.2% of carbon source.

①		②	①		②
炭素化合物		酸化性	炭素化合物		酸化性
フェノール	③	-	ピルビン酸	⑨	+
グルコン酸	④	+	コハク酸	⑩	+
リンゴ酸	⑤	+	カテコール	⑪	-
乳酸	⑥	+	エタノール	⑫	-
蟻酸	⑦	-	パラオキシ安息香酸	⑬	-
酢酸	⑧	±			

- Key: 1 Carbon compound  
 2 Decomposition property  
 3 Phenol  
 4 Gluconic acid  
 5 Malic acid  
 6 Lactic acid  
 7 Formic acid  
 8 Acetic acid  
 9 Pyruvic acid  
 10 Succinic acid  
 11 Catechol  
 12 Ethanol  
 13 Paraoxybenzoic acid

## [V] Other physiological properties

- Resistance to table salt: Growth can take place at 5-10% (V/V)
- Formation of 2,3-butanediol: It is formed significantly.
- Glucose/asparagin medium: Growth takes place.
- Lipase: -
- Coagulase: -

6. Lecithinase:  $\pm$
7. Müller's decarboxylase test:
  - Ornithine:  $\pm$
  - Lysine: -
  - Arginine: +
8. Glutamic decarboxylase: Not formed.
9. Methylene blue: The dye is reduced.
10. Casein: Not liquefied.
11. Decomposition property of uric acid: +
12. Decomposition property of horse uric acid: -
13. Edickman [transliteration] test: -
14. Sonley [transliteration] arginine test: +
15. Decomposition property of malonic acid: -
16. Phenylalanine dehydrogenase: -
17. Decomposition property of 5% lactic acid: +
18. Decomposition property of alginic acid: -
19. Protopectinase: -

The classification of this strain having the above-listed bacteriological properties is judged by comparison with Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7<sup>th</sup> edition). In consideration of the fact that this strain is a gram-negative short bacillus having flagella, that it is an aerobic microbe and can form acid and gas from glucose, that it does not form protopectinase, and it displays a negative M.R. test and a positive V.P. test, and that it can ferment lactose in an anaerobic way, it is judged that this strain belongs to the genus *Aerobacter*.

In addition, in consideration of the fact that this strain does not form gas from glycerin and that it can weakly liquefy gelatin, it is judged to be *Aerobacter cloacae*. In consideration of the fact that a capsule is formed, that the colony of the gelatin medium displays a light yellow color, that no gas is formed from litmus milk and peptone is not formed, that the gas formed from lactose is in trace amount, that acid [and] gas are formed from aesculin, and that acid is formed from starch, it is identified as a new strain of *Aerobacter cloacae*, and this strain is named as *Aerobacter cloacae* N414-M.

The strain used in this invention is *Aerobacter cloacae* N414-M as FERM-P No. 1779. However, the species is not limited to this one strain. Any strain that belongs to the *Aerobacter* genus and can generate high-viscosity polysaccharides may be used, not just limited to the natural strains.

When the aforementioned strain is used in the method of this invention, the cells of the strain may be used as they are. However, it is also possible to make use of the culture obtained

by inoculating the strain on conventional microbial culture medium, followed by liquid culturing. This strain does not hamper reproduction of conventional soy sauce yeast cells in the feed material for manufacturing soy sauce. Instead, it coexists well with the yeast cells.

In the following, the method for adding the cells of this strain or their culture will be explained specifically.

First of all, when the cells of this strain or their culture are used as the seed microbe for soy sauce, cells of a strain of *Aerobacter* and able to produce high-viscosity polysaccharides or their culture are inoculated and cultured in conventional soy sauce yeast culture made of bran, wheat, degreased soybeans, etc., beforehand, at the same time, or before or after inoculation of the soy sauce yeast cells, or they are mixed with the seed yeast prepared using the conventional method for use, followed by adding the mixture into the feed material for manufacturing the soy sauce.

In this case, corresponding to the viscosity of the desired soy sauce product, the cells of this strain or their culture are added in an appropriate amount. The amount of the strain added into 1 g (dry weight) of the feed material for manufacturing the soy sauce should be in the range of  $10^2$ - $10^7$  cells, or preferably in the range of  $10^3$ - $10^9$  cells.

When the cells of this strain or their culture are added during the conventional soy sauce yeast formation period, they are added during the period from inoculation of the seed yeast in the feed material for manufacturing the soy sauce to loading of the soy sauce yeast in the yeast formation chamber. It is particularly preferred that they be added and mixed within 20 h after loading of the soy sauce yeast.

When the cells of this strain or their culture are added into the soy sauce yeast, it is preferred that the adding time be as near the loading time as possible. For example, when they are added at the time of loading, the amount is in the range of  $10^3$ - $10^7$  cells for 1 g of the total weight of the feed material for manufacturing the soy sauce; when they are added at 20 h after loading, the amount becomes  $10^5$ - $10^9$  cells. Also, when they are added near output of the yeast, the amount of cells of the strain or their culture is increased significantly, and this is undesired from the economic viewpoint.

Also, the amount of conventional soy sauce seed yeast used in this invention should be in the range of 1/100 ~ 1/5000 with respect to the total weight of feed material for manufacturing the soy sauce.

Among the aforementioned feed material for manufacturing soy sauce, the protein feed material may be prepared as follows: Using the conventional method, after spraying water to degreased soybeans, peeled soybeans, gluten, or the like to a water content of 50-70% (W/W), or after adding water into the protein raw material to a water content of 30-70% (w/w) if necessary, they are heated under pressure by means of saturated steam at 1.8-7 kg/cm<sup>2</sup> (gauge pressure) and

130-170°C for 15 sec - 10 min. Then, they are quickly released to the atmosphere. On the other hand, the starch feed material may be prepared by frying wheat, barley, or the like, followed by crushing.

In the method for manufacturing yeast in this invention, the yeast is manufactured using the conventional method at 20-40°C for 3-4 days before taking out the yeast.

In the following, the mechanism for forming the thick substance by means of this strain will be explained. Due to the enzyme actions of protease, amylase, etc. formed during the reproduction process of the soy sauce yeast microbes on the polymer protein and starch present in the feed material for manufacturing soy sauce, various low molecular weight amino acids, glucose, etc. are formed. They are used as a culture medium, in which the cells of this strain are reproduced and the aforementioned thick substance is formed and accumulated in the soy sauce yeast in a significant amount.

In the following, an experimental example will be presented to explain the state of formation and accumulation of the thick substance during the yeast formation process.

#### Experimental example

30 g of degreased soybeans and 38 mL of tap water were loaded in a 500 cc Fernbach flask. After boiling and steaming in an autoclave at 1 kg/cm<sup>2</sup> (gauge pressure) for 45 min for pasteurization, it was left to cool. Then, 30 g of baked and crushed wheat were added, and the mixture was loaded in a 150 cc Erlenmeyer flask and heated at 135°C for 4 h for hot air pasteurization, followed by natural cooling. Then,  $2 \times 10^6$  cells of *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) were added, together with  $1 \times 10^8$  spores of *Aspergillus sojae* IAM 2669, a conventional yeast microbe for soy sauce. The mixture was blended and yeast was manufactured at 30°C using the conventional method. (Test) /5

On the other hand, yeast was also prepared in the same way as above, except that *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) was not added. (Control)

Viscosity was measured as follows. At times of 0, 24, 40, 64, and 88 h from the start of yeast formation, 50 g of the yeast were collected as a sample. After adding 200 mL of distilled water to the yeast sample, the sample was crushed by a homogenizer (product of Nippon Seiki K.K.), followed by filtering with filter paper. The specific viscosity of the filtrate was measured using an Ostwald viscometer at 20°C.

The method for measuring specific viscosity ( $\eta$ ) is described in "Jikken nogi kagaku" [Experimental farm chemistry], upper volume, p. 334, published in 1960 by Asakura Boostore.

The results of the this experimental example are shown in Figure 1.

It can be seen from Figure 1 that for yeast manufactured using both *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) and the conventional yeast microbe for soy sauce (Test), specific

viscosity rises gradually after starting the yeast formation process. After about 24 h, due to formation of the viscous substance, specific viscosity rises to reach a peak in 60-70 h. Then, specific viscosity decreases slowly.

On the other hand, for the control sample, specific viscosity rises slowly over the yeast formation time, yet the increase is small.

Then, an appropriate amount of saline was added into the obtained yeast, followed by loading, ripening, pressing/squeezing, and finishing using the conventional method to form a highly thick soy sauce that has excellent dispersibility.

In the following, this invention will be explained in detail with reference to application examples.

#### Application Example 1

40 g of bran and 30 mL of tap water were loaded in a 500 cc Fernbach flask. After boiling and steaming in an autoclave at  $1 \text{ kg/cm}^2$  (gauge pressure) for 60 min for pasteurization, it was left to cool to  $40^\circ\text{C}$ . Then,  $7 \times 10^5$  cells of *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) were added, together with  $1 \times 10^8$  spores of *Aspergillus sojae* IAM 2669, a type of yeast microbe for soy sauce, followed by sterile culturing at  $30^\circ\text{C}$  for 60 h to form a seed yeast.

Then, 3.3 kg of degreased soybeans were loaded in the autoclave, and 4.3 L of tap water were added. After water was absorbed by the soybeans, boiling and steaming under pressure of  $1 \text{ kg/cm}^2$  (gauge pressure) for 45 min was performed. When the obtained boiled and steamed product was cooled to  $40^\circ\text{C}$ , 10 g of said seed yeast were added, and then 3.1 kg of baked and crushed wheat were added. The mixture was blended and loaded in a yeast container to manufacture yeast at  $28\text{--}35^\circ\text{C}$  for 65 h.

During the yeast formation process, the mixture was stirred at 16 h and then at 22 h after loading, respectively.

Then, 12 L of 23% saline were added into the obtained yeast, followed by loading into a 20 L pot and ripening for 6 months at  $25\text{--}30^\circ\text{C}$ . Then, the conventional method was adopted for pressing/squeezing and finishing to form a highly thick and fragrant soy sauce.

On the other hand, as a control, soy sauce was manufactured in the same way as above, except that *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) was not used at all.

Analysis results for the aforementioned soy sauce samples are listed in Table 1.

Table 1

	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	
	比粘度	全窒素	ホルモール窒素	アンモニア窒素	還元糖	アルコール	pH
	(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(%)	
① 対照	3.15	1.485	0.952	0.228	2.30	2.25	4.80
② 試験	81.50	1.460	0.950	0.216	2.35	2.20	4.85

- Key: 1 Control  
 2 Test  
 3 Specific viscosity  
 4 Total nitrogen  
 5 Formol nitrogen  
 6 Ammonia nitrogen  
 7 Reducing sugar  
 8 Alcohol

The method for measuring specific viscosity is described in "Jikken nogi kagaku" [Experimental farm chemistry], upper volume, p. 334, published in 1960 by Asakura Boostore.

The other items for analysis of the soy sauce were measured using the methods described in I. Umeda: "Shoyu" [Soy sauce], published in 1961 by Sankyo Shuppan K.K.

### Application Example 2

After 140% of water was sprayed to degreased soybeans, the soybeans were heated by saturated steam under pressure of 6.0 kg/cm<sup>2</sup> (gauge pressure) for 30 sec, followed by rapid exhaust. 8.0 kg of the obtained boiled and steamed degreased soybeans were used in the manufacturing. 20 mL of physiological saline containing  $5 \times 10^9$  *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) cells were added. At the same time, 10 g of *Aspergillus sojae* IAM 2669 spores and 3.1 kg of baked and crushed wheat were added. The mixture was loaded in a yeast formation chamber to manufacture yeast at 28-35°C for 65 h.

12 L of 23% saline were added into the obtained yeast, and the mixture was loaded in a 20 L pot, followed by ripening for 6 months at 25-30°C. Then, the conventional method was adopted for pressing/squeezing and finishing to form a thick soy sauce.

On the other hand, as a control, soy sauce was manufactured in the same way as above, except that *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) was not used at all.

Analysis results for the aforementioned soy sauce samples are listed in Table 2.

Table 2

	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	
	比粘度	全窒素	ホルモール窒素	アンモニア窒素	還元糖	アルコール	pH
		(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(%)	
① 対照	3.15	1.525	0.990	0.248	2.40	2.00	4.80
② 試験	38.81	1.520	0.988	0.232	2.30	2.25	4.80

- Key: 1 Control  
 2 Test  
 3 Specific viscosity  
 4 Total nitrogen  
 5 Formol nitrogen  
 6 Ammonia nitrogen  
 7 Reducing sugar  
 8 Alcohol

### Application Example 3

430 mL of tap water were added to 330 g of degreased soybeans and the water was absorbed by the soybeans. Then, the soybeans were boiled and steamed under pressure of 1 kg/cm<sup>2</sup> (gauge pressure) for 45 min, and left to cool to 40°C. Then, the obtained substance was inoculated with 1 mL of a culture solution of  $5 \times 10^8$ /mL of bacteria prepared by culturing *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) in a conventional medium for culturing microbes (containing 1.5 g meat extract, 2.5 g polypeptone, 1.5 g table salt, and 500 mL distilled water, pH 7.2) at 30°C for 16 h. Then, a mixture of 1 g of *Aspergillus sojae* IAM 2669 seed yeast and 310 g of baked and crushed wheat were added, followed by manufacturing yeast at 28-35°C for 65 h.

During the yeast formation process, the mixture was stirred at 16 h and then at 22 h after loading, respectively.

Then, 1.2 L of 23% saline were added into the obtained yeast, followed by loading into a 5 L pot and ripening for 6 months at 25-30°C. The conventional method was adopted for pressing/squeezing and finishing to form a thick soy sauce.

On the other hand, as a control, soy sauce was manufactured in the same way as above, except that *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) was not used at all.

Analysis results for the aforementioned soy sauce samples are listed in Table 3.

Table 3

	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	
	比粘度	全窒素	ホルモール窒素	アモニア窒素	還元糖	アルコール	pH
		(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(%)	
① 対照	3.25	1.470	0.948	0.232	2.25	2.05	4.80
② 試験	4.230	1.470	0.945	0.219	2.20	2.10	4.80

Key:	1	Control
	2	Test
	3	Specific viscosity
	4	Total nitrogen
	5	Formol nitrogen
	6	Ammonia nitrogen
	7	Reducing sugar
	8	Alcohol

#### Application Example 4

430 mL of tap water were added to 330 g of degreased soybeans. Then, the soybeans were boiled and steamed under pressure of 1 kg/cm<sup>2</sup> (gauge pressure) for 45 min, and left to cool to 28°C. Then, 1 g of *Aspergillus sojae* IAM 2669 seed yeast and 310 g of baked and crushed wheat were added and mixed. The mixture was loaded in a yeast formation pot, followed by manufacturing of yeast at 28-33°C for 65 h.

During the yeast formation process, the mixture was stirred for 16 h. At this time, 2 mL of a culture solution of  $3 \times 10^9$ /mL of bacteria prepared by culturing *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779) in a conventional medium for culturing microbes (containing 1.5 g meat extract, 2.5 g polypeptone, 1.5 g table salt, and 500 mL distilled water, pH 7.2) at 30°C for 16 h were added for inoculation.

Then, 1.2 L of 23% saline were added into the obtained yeast, followed by loading into a 5 L pot and ripening for 6 months at 25-30°C. The conventional method was adopted for pressing/squeezing and finishing to form a thick soy sauce.

On the other hand, as a control, soy sauce was manufactured in the same way as above, except that 2 mL of liquid was added instead of *Aerobacter cloacae* N414-M (FERM-P No. 1779).

Analysis results for the aforementioned soy sauce samples are listed in Table 4.



Table 4

		③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	
		比粘度 全窒素 フォルモール アンモニア 還元糖 アルコール pH						
		(g/100ml) (g/100ml) (g/100ml) (g/100ml) (g)						
①	対照	3.10	1.456	0.932	0.242	2.00	2.15	4.80
②	試験	47.60	1.444	0.930	0.216	1.98	2.21	4.85

Key: 1 Control  
 2 Test  
 3 Specific viscosity  
 4 Total nitrogen  
 5 Formol nitrogen  
 6 Ammonia nitrogen  
 7 Reducing sugar  
 8 Alcohol

#### Brief description of the figure

Figure 1 is a diagram illustrating the yeast formation time (abscissa) versus specific viscosity (ordinate). This figure shows the state of formation of the [illegible] substance during the yeast formation process.

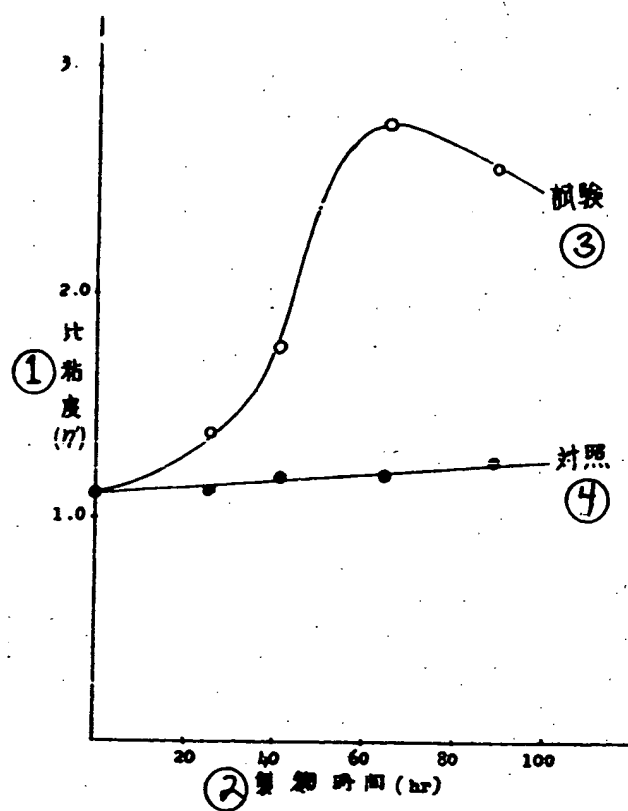


Figure 1

Key: 1 Specific viscosity  
 2 Yeast formation time  
 3 Test  
 4 Control



## End of Result Set



Generate Collection

L1: Entry 1 of 1

File: DWPI

Mar 3, 1975

DERWENT-ACC-NO: 1975-45162W

DERWENT-WEEK: 197527

COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Viscous shoyu prodn from a koji - obtd by inoculation of  
Aerobacter cloacae (FERM-P 1779)

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

KIKKOMAN SHOYU CO LTD

KIKK

PRIORITY-DATA: 1973JP-0070878 (June 25, 1973)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 50019996 A	March 3, 1975	N/A	000	N/A
JP 79001000 B	January 18, 1979	N/A	000	N/A

INT-CL (IPC): A23L 1/23; C12K 3/00

ABSTRACTED-PUB-NO: JP50019996A

BASIC-ABSTRACT:

A viscous shoyu was produced using a koji made by inoculating *Aerobacter cloacae* (FERM-P 1779) prodg. a high viscous polysaccharide together with *Aspergillus*. In an example, the microbe was inoculated to 40 g wheat bran contg. 30 ml water and pasteurized at 1 kg/cm<sup>2</sup> for 60 min at 7 x 10<sup>5</sup> cells together with 1 x 10<sup>8</sup> cells of *A. sojae* IAM 2669 and cultured at 30 degrees C for 60 min. To 3.3 kg defatted soybean steamed at 1 kg/cm<sup>2</sup> for 45 min, 10 g of the inoculum and 3.1 kg roasted and crushed wheat were added and cultivated at 28-35 degrees C for 65 hr. To the finished koji, 12 l. of 23% NaCl soln. were added and fermented at 25-30 degrees for 6 mths. The resulting shoyu had sp. viscosity 81.50 and total N 1.460, formol N 0.950, NH<sub>3</sub>-N 0.216, reducing sugar 2.35, and alc. 2.20%.

TITLE-TERMS: VISCOSITY SHOYU PRODUCE KOJI OBTAIN INOCULATE  
AEROBACTER CLOACA FERM P

DERWENT-CLASS: D13 D16

CPI-CODES: D03-H01C; D05-A;



特 許 公 報

昭和48年 6 月 25日

特許庁長官 三 宅 幸 夫 殿

1 発 明 の 名 称  
ネチヨウ/ヨクセ/セイ/ウホウ  
粘稠醬油の製造法

2 発 明 者

住 所 ノダシノダ  
千葉県野田市宮崎45  
氏 名 キタハラセイジ  
北 原 啓 之 (ほか2名)

3 特許出願人

郵便番号 278  
住 所 ノダシノダ  
千葉県野田市野田339番地  
氏 名 (447)キツコーマン醤油株式会社  
取締役社長 モギケイサヲ  
茂 木 啓 三 郎



明 細 書

1 発 明 の 名 称 粘稠醬油の製造法

2 特許請求の範囲

アエロバクター属に属し、高粘性多糖類生産能を有する菌株の菌体またはその培養物を、醤油用種麹製造に際し、あらかじめ醤油麹菌と同時にしくはその前後に接種して培養したものを用いるか、常法により得られた醤油用種麹と混合して用いるか、または通常の醤油麹製造中に接種し、あとは常法により製麹、仕込、熟成させることを特徴とする粘稠醬油の製造法。

3 発明の詳細な説明

本願発明は粘稠醬油の製造法に関し、その目的とするところはアエロバクター属に属し高粘性多糖類生産能を有する菌株の菌体またはその培養物を用いて粘稠性、香味および分散性等の著しく優れた粘稠醬油の製造法を提供することにある。

従来粘稠 油としては G.M.C. セラチン、アラビアゴム、グリセリン、可溶性澱粉等の市販の粘

① 日本国特許庁

## 公開特許公報

①特開昭 50-19996

④公開日 昭50.(1975) 3. 3

②特願昭 48-70878

②出願日 昭48.(1973) 6.25

審査請求 有 (全7頁)

序内整理番号 ⑤日本分類

7435 49 36(5)C2

PTO 2001-3342

S.T.I.C. Translations Branch

稠剤(調味科学35~42VOL/8、462、/97/ )あるいは精製ペクチン剤(特公昭38-994/ )等を市販醬油に直接添加したものが知られている。

しかしながら上述した如く単に粘稠剤を添加した醬油では、ある程度粘性の高いものは得られても、醬油自体の分散性、香味あるいは舌触り等の点に著しい欠点がある。

そこで本願発明者等は前記欠点を解消するため種々試験、研究を重ねた結果、井戸水の滯留水中より分離したアエロバクター属に属する1菌株が極めて優れた高粘性物質を生産すること、さらに本菌株は通常の醬油製造用原料を培養培地として醬油用麹菌と極めて良く共生し、そして醬油製造中前述の高粘性物質を著量に生成すること、さらにまた前述の如く本菌株を用いて製すれば粘稠性、芳醇な香味あるいは分散性等、いずれも著しく優れた油が得られること等の新知見を得て本願発明を完成した。

すなわち本願発明はアエロバクター属に属し高

1.0 μ / 1.5 ~ 2.0 μ の短桿菌である。

2. 細胞の多形性の有無 ; 無。

3. 運動性の有無 ; 有 ( / ないし 2 本の周毛を有する ) 。

4. 胞子の有無 ; 無。

5. グラム染色 ; 陰性。

6. カプセル染色 ; 認められる。

(II)、各培地における生育状態

1. 肉汁寒天平板培養 (培養温度 30℃、24 時間培養後の観察)

直径 2 ~ 5 mm の円形状の生育を示し、隆起している。

表面は平滑で、光沢があり、不透明である。

周縁は円形である。

2. 肉汁寒天斜面培養

線状に中程度の生育を示す。色沢は淡黄褐色で光沢があり、不透明である。特に臭いはなく、培地の色は変化しない。

3. 肉汁液体培養

中程度の生育を示し、極めて僅かに脆い環を形

8.  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  の変化性 ; 単一窒素源として利用し得る。

9. 色素の生成 ; -

10. ウレアーゼ (クリステンセン氏の方法) ; -

11. オキシダーゼ (コバク氏の方法) ; -

12. カタラーゼ ; +

13. 生育の可能な範囲 ; pH 4.0 ~ 9.0, 湿度 5 ~ 42℃

14. 生育の最適範囲 ; pH 6.0 ~ 7.0, 温度 30 ~ 37℃

15. 酸素に対する態度 ; 通性好気性

16. O - F テスト (フー & リファースン培地)

グルコース ; 酸およびガス生成

シュクロース ; 酸およびガス生成

ラクトース ; 酸のみ生成

17. マッコンキー培地 ; 淡赤紫色コロニー形成

18. アンモニアの生成 ; +

19. マニトール寒天培地 ; 生育しない。

20. ガス組成 (グルコース培地) ;  $\text{CO}_2 : \text{H}_2 = 3 : 1$

(IV)、炭素源の利用性 (30℃、14 日間静置)

1. 糖類の発酵性

試験方法はジ・ビー・ロビンズ (G. B. Robbins)

粘性多糖類生産能を有する菌株の菌体またはその培養物を、醤油用糖麹製造に際し、あらかじめ醤油麹菌と同時にしくはその前後に接種して培養したものを用いるか、常法により得られた醤油用糖麹と混合して用いるか、または通常の醤油麹製造中に接種し、あとは常法により製麹、仕込、熟成させることを特徴とする粘稠醤油の製造法である。

本願発明方法により得られる粘稠醤油は著しく芳醇で濃厚な香味を有し、分散性が良く滑らかで、しかも極めて粘稠性の優れたものであり、粘度で 5 ~ 100 程度の粘稠な醤油である。

次に本願発明における使用菌について具体的に説明する。

本願発明方法の使用菌の 1 菌株アエロバクター・クロカエ N 4 / 4 - M は、工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研菌寄第 / 779 号 (FERM - P 6 / 779) として寄託されているが、先ず該菌株の菌学的性質について詳細に説明する。

(I)、形態

1. 細胞の形および大きさ ;

成する。沈殿の量は多く、粘質である。

4. 肉汁ゼラチン穿刺培養

上層部が最も生育良好で、極めて弱い液化性がある。液化の形状は噴火口状である。

5. リトマスミルク

酸を生成し、凝固する。ペプトン化はしない。

6. ゼラチン平板培養

斑点状の生育を示し、液化する。コロニーは淡黄色を呈する。

7. 馬鈴薯培地

中程度の生育を示し、色沢は淡黄白色で光沢あり、平滑で色素は産生しない。

(II)、各生理学的性質

1. 硝酸塩の還元 ; +

2. M R テスト ; -

3. V P テスト ; +

4. インドールの生成 ; -

5. 硫化水素の生成 (T.S.I 培地) ; -

6. デンプンの加水分解 ; - (2 日間培養)

7. シモンズのクエン酸培地 ; 変化する。

等の発酵試験法 (J. Bact. 39, 399, 1940) による。

酸生成ガス生成		酸生成ガス生成	
(1) L-アラビノース	+	(13) デンブリン	+
(2) D-キシロース	+	(16) ラムノース	-
(3) D-グルコース	+	(17) メリビオース	+
(4) D-マンノース	+	(18) セロビオース	+
(5) D-フラクトース	+	(19) ラフィノース	+
(6) D-ガラクトース	+	(20) メレチトース	-
(7) マルトース	+	(21) イヌリン	-
(8) シュクロース	+	(22) デキストリン	+
(9) ラクトース	+	(23) グリコーゲン	-
(10) レハコース	+	(24) アドニトール	-
(11) D-ソルビトール	+	(25) ズルチトール	-
(12) D-マニトール	+	(26) サリシン	+
(13) ノシトール	±	(27) エスクリン	+
(14) グリセロール	+	(28) α-メチルβクコンド	+

オルニチン ; ±

リジン ; -

アルギニン ; +

8. グルタミン酸脱炭酸酵素 ; 生産せず。

9. メチレンブルー ; 色素が還元される。

10. カゼイン ; 液化しない。

11. 尿酸の発化性 ; +

12. 馬尿酸の発化性 ; -

13. エジクマン試験 ; -

14. ソンレイ・アルギニン試験 ; +

15. マロン酸の発化性 ; -

16. フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ ; -

17. 5% 乳糖の発化性 ; +

18. アルギン酸ソーダの発化性 ; -

19. プロトベクチナーゼ ; -

以上のような菌学的性質を有する本菌株の分類学上の位置を、バージイのマニアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー第7版 (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7 ed) に照合した結果、本菌

2. 有機酸および炭素化合物の発化性

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

0.5% 炭素源 0.2% の培地で試験した。

炭素化合物	発化性	炭素化合物	発化性
フェノール	-	ビルビン酸	+
グルコン酸	+	コハク酸	+
リンゴ酸	+	カテコール	-
乳酸	+	エタノール	-
蟻酸	-	パラオキサン安息香酸	-
酢酸	±		

(V)、その他の生理的性質

1. 食塩耐性 ; 5~10% (V/V) まで生育可能。

2. 2・3・ブタンジオールの生成 ; 強く生成。

3. グルコース・アスパラギン培地 ; 生育する。

4. リパーゼ ; -

5. コアグララーゼ ; -

6. レシチナーゼ ; ±

7. メーラーのデカルボキシラーゼ試験 ;

株はグラム陰性の短桿菌でしかも周鞭毛を有すること、好気性菌でグルコースから酸とガスを生成し、プロトベクチナーゼを生成せず、M.R. テストが陰性、V.P. テストが陽性であること、さらに乳糖を嫌氣的に発酵することから、アエロバクター属に属する菌株であると判定される。

さらに本菌株はグリセリンからガスを生成せず、セラチンを弱く液化することから、アエロバクター・クロカエ (*Aerobacter cloacae*) と判定されるが、カプセル (莢膜) を形成すること、セラチン培養のコロニーが淡黄色であること、リトマスミルクからガスを生成せず、またペプトン化もしないこと、乳糖からのガス生成は直線程度であること、エスクリンから酸ガスを生成すること、さらにデンブリンから酸を生成すること等の点からアエロバクター・クロカエの新菌株であると判定し、本菌株をアエロバクター・クロカエ N 4 / 4 - M と命名した。

本菌発芽における使用菌株としては、たとえば上記したアエロバクター・クロカエ N 4 / 4 - M

第1研究第1779号(ERM-P.6/779)が挙げられるが、この菌株だけでなくアエロバクター属に属する菌株でも粘多糖を生成する菌株であれば、自然株に限ることなく、すべて使用できる。

本願発明方法において前記した菌株を使用する際、該菌株の菌体をそのまま用いるか、または該菌株を通常の細菌培養培地に接種し常法により液体培養して得られた培養物を用いるが、本菌株は、かかる醤油醸造原料中でも通常の醤油用細菌の増殖を全く阻害することなく、該細菌と極めて良く共生する。

以下、本願発明において本菌株の菌体またはその培養物の添加方法を具体的に説明する。

先ず本菌株の菌体またはその培養物を醤油用細菌として使用する場合には、あらかじめ醤油麹菌と同時またはその前段に小麦、脱脂大豆等の通常の醤油用細菌培地へ順次接種培養して得られたものか、または本菌株の菌体もしくはその培養物を、常法により通常の細菌培地に醤油麹菌を培

養して得られた醤油麹菌と共に混合したものを、醤油醸造原料に添加、混合する。

この際、所要醤油製品の種類に応じて本菌株の菌体またはその培養物を適宜の濃度加すればよく、該菌株の添加量は醤油醸造原料の総重量/8当たり $10^2 \sim 10^7$ 個、最も好ましくは $10^3 \sim 10^6$ 個程度添加するのがよい。

また本菌株の菌体またはその培養物を通常の油麹製造期間中に添加する場合には、常法により通常の細菌を醤油醸造原料に接種したのち、これを製麹室に盛込み出麹されるまでの製麹期間中に添加すればよく、特に好ましい添加時期としては醤油麹の盛込時より20時間以内に添加、混合するのがよい。

本菌株の菌体またはその培養物を醤油麹に添加する際、なるべく盛込時に近い時期に添加するのが望ましく、たとえば盛込時では醤油醸造原料の総重量/8当たり $10^3 \sim 10^7$ 個、盛込時より20時間後では $10^0 \sim 10^6$ 個添加し、また出麹時に近い時期に添加する場合には該菌株の菌体またはそ

の培養物の添加量を著しく増加させねばならず、経済的にやゝ不利となる。

なお本願発明に用いられる通常の醤油用細菌の添加量は醤油醸造原料の総重量の $\frac{1}{100} \sim \frac{1}{5000}$ 程度である。

また前記した醤油醸造原料のうち、蛋白質原料は大豆、脱脂大豆、脱皮大豆、グルテン等を常法により水分含量50~70%(W/W)程度になるように加水したのち蒸煮したものか、または該蛋白質原料をそのままか、必要により水分含量30~70%(W/W)となるように加水したのち飽和蒸気を用いて圧力 $1.8 \sim 7 \text{ kg/cm}^2$ (ゲージ圧)、温度 $130 \sim 170^\circ\text{C}$ 、15秒~10分間加圧加熱したのち、急激に大気圧下に放出したもの等であり、また澱粉質原料としては小麦、大麦等を炒熟割砕して得たものである。

なお本願発明における製麹方法としては、常法により麹品温 $20 \sim 40^\circ\text{C}$ で3~4日間製麹し出麹とする。

こゝで本菌株による粘稠性物質の生成機構を説

明すれば、先ず醤油醸造原料中に存在する高分子の蛋白質や澱粉質のものが、通常の醤油麹の増殖過程で生産されるプロテアーゼやアミラーゼ等の酵素作用を受けた結果、生成される低分子の糖々のアミノ酸やグルコース等を培養培地として、本菌株は増殖し上述の粘性物を醤油麹中に蓄積する。

以下実験例を挙げ製麹過程で粘稠物質が生成、蓄積される状態を説明する。

#### 実験例

脱脂大豆30gおよび水道水38mlを500cc容フエルンバツファ・フラスコに入れ、これをオートクレーブ内で $1 \text{ kg/cm}^2$ (ゲージ圧)、45分間蒸煮殺菌後放冷したもの、炒熟割砕小麦30gを加え、これを150cc容三角フラスコに収容し、 $135^\circ\text{C}$ で4時間乾熱殺菌後放冷した。このものにアエロバクター・クロカエNM4/4-M(ERM-P.6/779)の菌体を $2 \times 10^6$ 個添加し、同時に通常の醤油用細菌としてアスペルギルス・ソー IAM 2569の孢子を $1 \times 10^8$ 個添加

混合し、これは常法により 30℃ で製麹したものの。(試験)

上記方法においてアエロバクター・クロカエ N 4 / 4-M (FERM-P 16 / 779) 菌株を全く添加せずに製麹したもの。(対照)

なお粘度の測定は製麹開始時より 0、24、40、64、88 時間夫々個々に製麹した麹を 50g づつ採取し、これらに蒸留水を 200 ml づつ添加したのち、ホモゲナイザー(日本精機株式会社製)で撹拌し濾紙濾過して得た濾液を、オストワルド粘度計を用いて 20℃ で比粘度を測定した。

比粘度( $\eta$ )の測定法は昭和 35 年版「実験農芸化学、上巻 334 頁」(朝倉書店発行)に記載の方法によつた。

本実験例の結果を第 1 図に示した。

すなわち第 1 図より明らかなようにアエロバクター・クロカエ N 4 / 4-M (FERM-P 16 / 779) 菌株を通常の醤油麹と共生させ製造した麹(試験)の比粘度は、製麹開始より徐々に上昇し初め 24 時間程度経過してから粘性物の生成により

比粘度が増加し 60~70 時間でピークに達し、その後はわずかに低下してくる。

また対照の比粘度は製麹時間の経過につれ徐々に上昇傾向は見られるが極めて少である。

次いで得られた麹に適量の量の食塩水を添加したのち、あとは常法により仕込、熟成、压榨、製成処理すれば極めて濃厚で分散性の良い粘稠な醤油が得られる。

以下実施例を挙げ本願発明を具体的に説明する。

#### 実施例 1

麹 40g と水道水 30 ml を 500 cc 容フエルンバッファー・フラスコに入れ 1 kg/cm<sup>2</sup>(ゲージ圧)で 60 分間加圧殺菌したのち、このものゝ品温が 40℃ に低下したときアエロバクター・クロカエ N 4 / 4-M (FERM-P 16 / 779) 菌株を  $7 \times 10^8$  個および醤油用麹菌としてアスペルギルス・ノーヤ IAM 2669 の胞子を  $1 \times 10^8$  個、同時に接種し 30℃ で 60 時間無菌的に培養を行なつて種麹を得た。

次いでオートクレーブに脱脂大豆 3.3 kg を投入

第 1 表

	比粘度	全窒素	アミノ酸 窒素	アミノ酸 窒素	還元糖	アミノ酸	pH
		(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(%)	
対照	3.15	1.485	0.952	0.228	2.30	2.25	4.80
試験	8.150	1.460	0.950	0.216	2.35	2.20	4.85

し、さらに水道水 4.3 l を加え吸水させたのち 1 kg/cm<sup>2</sup>(ゲージ圧)で 45 分間加圧蒸煮した。得られた蒸煮物の品温が 40℃ に低下した時点で前述の種麹 10g を加え、さらに炒熟割砕小麦 3.1 kg を添加、混合し、これを麹蓋に盛込み 28~35℃ で 65 時間製麹した。

なお製麹中の手入は盛込後 16 時間と 22 時間目に行なつた。

次いで得られた麹に 23% 食塩水 1.2 l を加えたのち、これを 20 l ボットに仕込み 25~30℃ で 6 ヶ月間熟成させ、あとは常法により压榨、製成することにより香味のよい極めて粘稠性の優れた醤油が得られた。

なお対照はアエロバクター・クロカエ N 4 / 4-M (FERM-P 16 / 779) を全く使用することなく、前記と全く同様な方法で製造した醤油である。

上述の如くして得られた醤油の分析値を第 1 表に示す。

なお比粘度の測定法は昭和 35 年版「実験農芸化学、上巻 334 頁」(朝倉書店発行)に記載の方法によつた。

また他の醤油分析項目は昭和 36 年発行、梅田勇雄著「醤油」(三共出版 K.K.)に記載の方法により測定した。

#### 実施例 2

脱脂大豆に 140% 浸水後飽和水蒸気で 6.0 kg/cm<sup>2</sup>(ゲージ圧)30 秒間加熱加圧したのち急激に大気圧下に放出して得た蒸煮脱脂大豆のうち 8.0 kg を採取し、このものにアエロバクター・クロカエ N 4 / 4-M (FERM-P 16 / 779) を  $5 \times 10^8$  個含有させた生理食塩水 20 ml を添加し、同時にアスペルギルス・ノーヤ IAM 2669 の



種菌を10gおよび砂糖粉小麦を3/4を加え、これを製麹室へ送込み28～35℃、65時間製麹した。

得られた麹に23%食塩水1.2Lを加え20Lポットに仕込み25～30℃で6ヶ月間熟成させ、あとは常法により圧搾、製成することにより粘稠な醤油が得られた。

なお対照はアエロバクター・クロカエN4/4-M (FERM-P 6/779)を使用することなく、前記と全く同様な方法で製造した醤油である。

得られた醤油の分析値を第2表に示す。

第 2 表

	比粘度	全窒素 (g/100ml)	フォルモール 窒素 (g/100ml)	アミノア 窒素 (g/100ml)	還元糖 (g/100ml)	アルコール (%)	pH
対照	3.15	1.525	0.990	0.248	2.40	2.00	4.80
試験	3.881	1.520	0.988	0.232	2.30	2.25	4.80

## 実施例3

脱脂大豆330gに430mlの水道水を加え吸水させたのち、1 kg/cm<sup>2</sup>(ゲージ圧)で45分間加

ある。

この結果を第3表に示す。

第 3 表

	比粘度	全窒素 (g/100ml)	フォルモール 窒素 (g/100ml)	アミノア 窒素 (g/100ml)	還元糖 (g/100ml)	アルコール (%)	pH
対照	3.25	1.470	0.948	0.232	2.25	2.05	4.80
試験	4.230	1.470	0.945	0.219	2.20	2.10	4.80

## 実施例4

脱脂大豆330gに430mlの水道水を加水し、飽和蒸気を用いて1 kg/cm<sup>2</sup>(ゲージ圧)で45分間加圧蒸煮したのち、このもの、品温が28℃になった時点で醤油用種菌としてアスベルギルス・ソーヤIAM2669の種菌を1gと砂糖粉小麦3/4を加え、混合したのち、これを麹室に送込み28～33℃で65時間製麹した。

み麴中盛込時より1/6時間目の手入時に、アエロバクター・クロカエN4/4-M (FERM-P 6/779)を予め細菌培養培地(肉エキス1.5g、ポリペプトン2.5g、食塩1.5g、蒸留水500

ml)に接種し、このもの、品温が40℃以下になった時点で、このものにアエロバクター・クロカエN4/4-M (FERM-P 6/779)を予め通常の細菌用培地(肉エキス1.5g、ポリペプトン2.5g、食塩1.5g、蒸留水500ml、pH 7.2)で30℃、1/6時間前培養して得た培養液(菌体数、 $5 \times 10^6$ /ml 個)/mlを接種し、さらにアスベルギルス・ソーヤIAM2669の種菌を1gと砂糖粉小麦3/4を混合したものを含加したのち、このものを28～35℃で65時間製麹した。

なお製麹期間中1/6時間および2/2時間目に手入操作を行なった。

次いで得られた麹に23%食塩水1.2Lを加え5Lポットに仕込み、25～30℃で6ヶ月間熟成させ、あとは常法により圧搾、製成することにより粘稠な醤油が得られた。

なお対照としてはアエロバクター・クロカエN4/4-M (FERM-P 6/779)を全く使用することなく前述の方法と同様に製造した醤油で

め、pH 7.2)で30℃、1/6時間前培養して得た培養液(菌体数、 $3 \times 10^6$ /ml 個)2mlを接種し充分混合した。

次いで得られた麹に23%食塩水1.2Lを加え5Lポットに仕込み25～30℃で6ヶ月間熟成させ、あとは常法により圧搾、製成することにより粘稠な醤油が得られた。

対照は製麹中アエロバクター・クロカエN4/4-M (FERM-P 6/779)の培養液の代りに、2mlの滅菌水を添加し、その他は前記と全く同様な方法で製造した醤油である。

得られた醤油の分析値を第4表に示す。

第 4 表

	比粘度	全窒素 (g/100ml)	フォルモール 窒素 (g/100ml)	アミノア 窒素 (g/100ml)	還元糖 (g/100ml)	アルコール (%)	pH
対照	3.10	1.456	0.932	0.242	2.00	2.15	4.80
試験	4.760	1.444	0.930	0.216	1.98	2.21	4.85

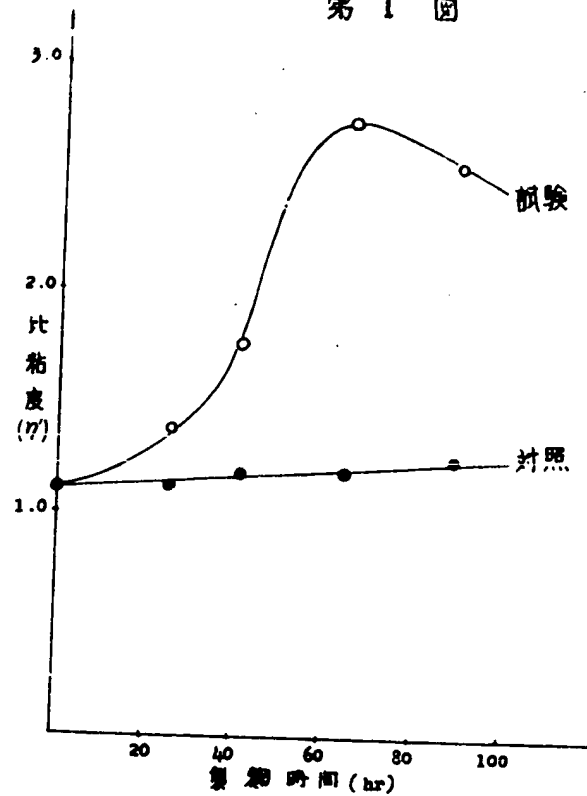
この菌の簡易な説明

第1図は培養に要する時間、発酵に比粘度を示し

・ 製剤中の有効物質の生成状態を示したものである。

特開昭50-19996(7)

第 1 図



特許出願人 キッコーマン醤油株式会社

#### 4. 添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 通
- (2) 図 面 1 通
- (3) 微生物受託番号通知書 (写) 1 通
- (4) ジェイ・エフ・シー・シー・カタログ  
(1966年版) (写) 1 通
- (5) 願 書 副 本 1 通

#### 5. 前記以外の発明者

住 所 ノダシナカネ  
千葉県野田市中根140-51  
氏 名 ミズノ マサキ  
水 沼 武 二

住 所 ノダシノダ  
千葉県野田市野田350-6  
氏 名 モギ コウヤ  
茂 木 孝 也